Über die Identität des Bacillus Nicotianae Uyeda mit dem Bacillus solanacearum Smith

von

J. A. HONING, in Medan (Sumatra).

EINLEITUNG.

Eine auf Sumatra für den Tabaksbau sehr gefährliche Krankheit ist die „slijmziekte", Welkkrankheit oder Schwarzbeinigkeit. Schon 1897 hatte v. Breda de Haan [1]) sie als eine bakterielle Krankheit erkannt, und Raciborski, [2]) Hunger [3]) und Jensen [4]) haben später die Bakterie identifiziert mit dem *Bacillus solanacearum* Smith, obwohl Smith [5]) selbst damals behauptete, dass diese auf *Solanum melongena* wuchernde Bakterie nicht im Stande wäre den Tabak anzugreifen.

Auch in Japan kennt man dieselbe Schwarzbeinigkeit des Tabaks, allein der Erreger soll ein anderer sein,

1) v. Breda de Haan. De slijmziekte in de Tabak in Deli. Teysmannia VIII, 1897.

2) Raciborski, Parasitische Algen und Pilze Javas. Teil I. S. 9.

3) Hunger, F. W. T. Overzicht der ziekten en beschadigingen van het blad bij Deli-Tabak. Mededeelingen uit 's Lands Plantentuin XLVII, 1901.

4) Jensen, Hj. Onderzoekingen over Tabak der Vorstenlanden. Verslag over het jaar 1908.

5) Smith, Erwin F., A bacterial disease of the tomato, eggplant and irish potato. Department of agriculture, Division of vegetable Physiology and Pathology. Bull. No. 12, 1896.

Bacillus Nicotianae Uyeda [1]), sehr nahe verwandt mit der Smithschen Bakterie, aber wie Uyeda meinte, sowohl an Nährpflanze als an Kulturmerkmalen verschieden. Was die Nährpflanze anbelangt, Smith hat seine Behauptung, der Tabak wäre unempfindlich gegen *Bacillus solanacearum*, zurückgenommen [2]); diese Bakterie ist eben die Ursache der Welkkrankheit des amerikanischen Tabaks. Dieser Unterschied zwischen den beiden Bakterien fällt also weg. Die sogar ziemlich grossen kulturellen Differenzen sind soweit ich weiss niemals ausgeglichen worden, und weil die Bakterie des Deli-Tabaks weder mit dem amerikanischen noch mit dem japanischen Krankheitserreger in jeder Hinsicht übereinstimmt, (vielleicht verschieden ist von dem javanischen), wird die Fragestellung: Wird die Schwarzbeinigkeit oder Welkkrankheit von *Nicotiana Tabacum* verursacht durch eine Bakterienart oder durch mehrere verwandte Arten, m. a. W und in beschränkterer Form gesagt: ist der *Bacillus Nicotianae* Uyeda identisch mit dem *Bacillus solanacearum* Smith oder muss er wirklich als eine selbständige Art (wie auch die delische und javanische?) betrachtet werden?

Nur ausführliche Untersuchungen können eine befriedigende Antwort geben. Sehr wünschenswert wäre die gleichzeitige Kultur aller dieser Arten oder Stämme. Zwar ist es möglich die Kulturen zu übersenden, aber ich darf doch nicht hoffen aus Amerika oder Japan Kulturen zu empfangen, welche noch mit den meinigen verglichen

1) Uyeda, Y. *Bacillus Nicotianae*, Sp. nov; die Ursache der Tabakwelkkrankheit oder Schwarzbeinigkeit in Japan. The Bulletin of the imperial central agricultural experiment station, Japan. Vol. I, No. 1. p. 39—57. 1905.

2) Smith, Erwin F. The Granville tobacco wilt. U. S. Departement of agriculture. Bur. of plant industry. Bull. No. 141. Part. II.

werden können. Denn vier mir von Herrn Dr. Hj. Jensen freundlichst aus Java zugeschickte Kulturen hatten, obwohl sie in Peptonbouillon sehr gut wachsen wollten, schon ihre Virulenz verloren, sogar für ganz junge Stengel.

Ausführliche Untersuchungen waren für die „Deli"-Bakterie geboten um sie auch in dem Boden mit Sicherheit bestimmen zu können. Das ganz besondere Bausystem, — eine Brache von sieben Jahren folgt nämlich jeder Anpflanzung — macht es beschwerlich zu wissen, ob die Felder, welche vor acht Jahren mit Verlust bebaut worden sind, jetzt mit Vorteil bepflanzt werden können oder ob man sie besser unbestellt lässt. Beispiele von ausführlichen Beschreibungen von Bodenbakterien gibt Gottheil,[1]) von Pflanzenparasiten van Hall[2]). Die Anzahl der von ihnen verwendeten Stickstoff- und Kohlenstoffquellen habe ich noch vergrössert in der Hoffnung charakteristische Merkmale zu finden.

Die Mühe nach kranken wildwachsenden Pflanzen zu suchen, um das immer neue Infizieren des Tabaks auch nach einer siebenjährigen Brache verständlich zu machen, falls die keine Sporen bildende Bakterie nicht saprophytisch sich halten konnte, war nicht umsonst. Von derselben Bakterie wurden befallen gefunden: *Physalis angulata* L., *Acalypha boehmerioides* Miq., *Blumea balsamifera* D. C., *Synedrella nodiflora* Grnt, *Ageratum conyzoides* L.

Infektionsversuche.

Eine Eigentümlichkeit des *Bacillus solanacearum* ist, dass er in der Kultur oft bald die Virulenz verliert (was

1) Gottheil, O. Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. Centrbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. VII. 1901.

2) van Hall, C. J. J. Bijdragen tot de kennis der bakterieele plantenziekten. 1902.

leider anfangs Smith irre machte und was auch später constatiert worden ist). So hatte auch Jensen 1904 und 1905 keinen Erfolg mit seinen Impfversuchen, während jedoch 1908 von 48 von ihm infizierten Pflanzen 46 mehr oder weniger stark von der Krankheit ergriffen wurden. Meine Erfahrungen in Deli waren etwa dieselben; teilweise hatten die Infektionen positiven Erfolg, teilweise gar keinen. Es waren folgende Versuche:

1. Der Boden von 24 Pflanzen wurde gemischt mit fein gehackten kranken Stengeln: 15 Pflanzen wurden welkkrank und von den 24 Kontrollpflanzen keine einzige.

2. Am 23. Mai 1910 pflanzte ich 300 pflanzreife Sämlinge, in 12 Partien von je 25, von denen vier Gruppen auf eine lange Reihe kamen. Die Zahlen in der folgenden Tabelle stellen die Anzahl toter oder kranker Bäume dar.

Die Anzahl kranker oder schon toter Bäume von je 25. der am 23. Mai infizierten Exemplare.

Nr.	Reihe.	Stelle der Inf.	10. Juni.	18. Juni.	29. Juni.	13. Juli.	1. Aug.
1	Kontrolle	—	1	3	7	10	10
2	Infiziert	Wurzeln	2	7	19	22	22
3	„	„	0	5	18	21	22
4	Kontrolle	—	0	1	7	7	8
5	„	—	0	2	4	6	6
6	Infiziert	Stengelbasis	15	17	23	25	25
7	Kontrolle	—	1	2	7	7	7
8	Infiziert	Wurzeln	4	9	18	23	24
9	„	Stengel	19	24	24	24	24
10	„	Blattnerv	8	11	20	22	24
11	„	Wurzeln	3	12	21	23	25
12	„	„	5	5	19	23	23

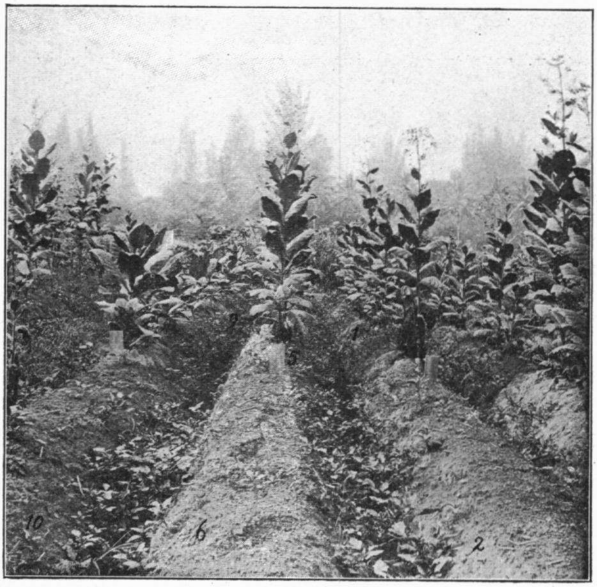


Fig. 1.

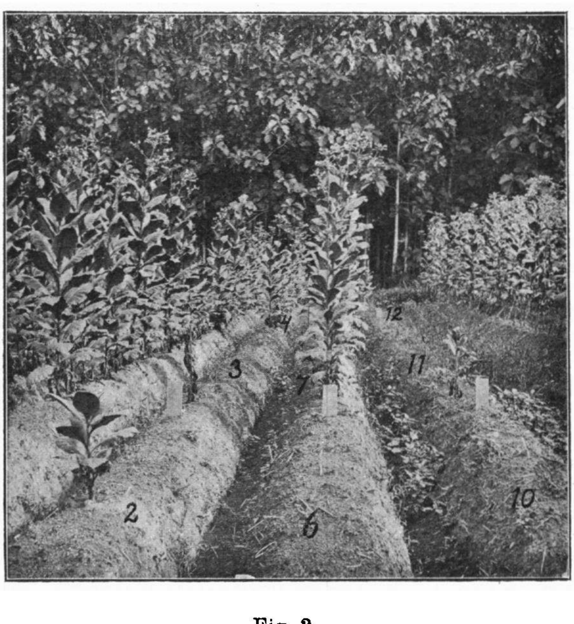


Fig. 2.



Fig. 3.

Das Infizieren war vorgenommen indem die aus dem Beete gezogenen Sämlinge einige Minuten lang in eine Schüssel mit einer stark verdünnten Bouillonkultur der Bakterie gestellt wurden (2), oder indem der Boden mit Bakterien haltendem Wasser begossen wurde (3, 8, 11 und 12), oder indem mittelst einer Spritze ein Weniges von einer Kultur unten in den Stengel der Pflanzen eingebracht wurde (6), oder etwas höher am Stengel in die Blattbasis (9), oder in den Blattnerv (10).

Aus den Zahlen ersieht man, dass dies alles dasselbe Ergebnis hat, nur sterben die Pflanzen, wenn die Bakterie von den Wurzeln aufgenommen wird, etwas später als nach Einspritzen in den Stengel. Und auch nach Impfung in den Blattnerv kann der Stengel längere Zeit gesund bleiben (Vergl. 10 mit 9).

Dass auch auf den Kontrollparzellen verhältnismässig viele Exemplare erkrankten, beweist, dass der Boden infiziert war.

3. Zweimal pflanzte ich 300 Sämlinge. Beide Male wurde von 100 Pflanzen der Boden ringsum durchtränkt mit Wasser, worin *alte* Kulturen gebracht waren. Erkrankung blieb aus.

4. Von fünf Reihen von je 100 Bäumen wurden nur die vorderen 50 infiziert durch Eintauchen der Wurzeln in stark verdünnte Bouillonkulturen. Die sechste Reihe war ganz Kontrollreihe und zeigte 19 Kranke in den vorderen 50, und 15 in den hinteren. Weil die unter No. 2 mitgeteilten Versuche vor vier Monaten an der Stelle der reihen 4 bis 6 gemacht waren, so konnte man dort eine grössere Mortalität erwarten; vielleicht erklärt dieser Umstand auch die grosse Anzahl toter Bäume in der Kontrollhälfte der dritten Reihe. Die Zahlen waren folgende.

DIE ANZAHL TOTER BÄUME VON JEDER REIHE
(50 INFIZIERTEN UND 50 KONTROLL-EXEMPLAREN).

STAMM AUS.	TOTE INFIZIERTE B.	TOTE KONTROLL B.	DIFFERENZ.
Acalypha boehmerioides	10	5	5
Blumea balsamifera	28	3	25
Tabak	38	18	20
Mucuna spec.	10	13	— 3
Tabak	20	23	— 3

Nur zwei von den fünf Stämmen hatten also ihre Virulenz während der Kultur behalten.

5. An jungen Tabaks-pflanzen in Töpfen wiederholte ich die Impfversuche mit denselben wechselnden Resultaten:

HERKUNFT DER BAKTERIE.	INFIZIERT.	ERKRANKT.
Tabak *a*	10	0
„ *b*	10	10
„ *c*	20	20
Ageratum conyzoides	10	10
Blumea balsamifera.	10	0
(29 Kontrollexemplare)	0	0

Nach dem Misserfolg mit dem Stamme Tabak *a* auf Tabak wundert es mich nicht, dass keine einzige der Infektionen mit diesem Stamme an 377 zu 7 Arten gehörenden Pflanzen, welche für Wechselbau verwendet werden, positives Resultat hatte.

6. Auch die „Erholungsimpfungen" liefern den Beweis für den infektiösen Charakter der Welkkrankheit. Als Beispiel wil ich noch eine Reihe aus über 300 Impfungen mitteilen:

INFIZIERTE PFLANZE.	STAMM. [1]	ANZAHL.	ZAHL DER KRANKEN.
Tabak	Aa	10	10
„	Ab	10	10
„	Aa T_1	10	10
„	Tb T_1	10	9
„	Tc T_1	10	9
„	Tc T_3	10	8
„	Td	10	10

1) Die verschiedenen Stämme sind angedeutet mit Ta, Tb, Tc u.s.w. falls sie aus Tabak isoliert sind. Jedesmal, wenn sie in Tabak übergeimpft und daraus wieder isoliert sind, wird ein T dazugestellt (bei Isolierung aus mehr als einer infizierten Pflanze mit 1, 2, 3 u.s.w. bezeichnet um die Parallelkulturen unterscheiden zu können). A deutet dasselbe für Stämme aus *Ageratum conyzoides* an, Ph für diejenigen aus *Physalis angulata* L., B aus *Acalypha boehmerioides* Miq.

7. Das Resultat der vergleichenden Versuche in Tokio war:

a. Bacillus Nicotianae: „Parasitisch für Nicotiana tabacum und Capsicum, nicht aber für Eierpflanze und Tomate."

b. Bacillus solanacearum: Parasitisch für Eierpflanze und Tomate, nicht aber für Nicotiana und Capsicum."

Wenn diese Resultate konstant widerkehren nach Impfung mit mehreren Stämmen, so hat man mit zwei Bakterienarten zu tun, aber bei Uyeda ist von mehreren Stämmen nicht die Rede, und also darf man auf Grund dieser Befunde nicht auf die Annahme einer neuen Spezies schliessen.

Mit den genannten Arten ausser Tabak und noch einigen anderen, zum Teil für Wechselbau wichtigen Pflanzen, gewann ich folgende Resultate:

INFIZIERTE PFLANZE.	STAMM.	ANZAHL INF.	ANZAHL KRANKE.
Eeierpflanze *a* (Frucht weiss)	Tc T_1	12	12
„ *b* („ rot)	Tc T_3	14	14
„ „	Tc T_1 T_2 T_1	3	3
„ „	Tg	4	4
Acalypha boehmerioides	Tc T_1	7	7
Kartoffel (8 Stengel v. 2 Knollen)	Ab T	8	8
„ (8 „ „ 3 „)	Tc T_1 T_1	8	8
Mucuna spec.	Tn	9	2
Indigofera arrecta	Tn	9	9
Sesam (schwarzer)	Tm	12	12
„	Tn	11	11
Tomate	Tm	11	11
„	Tn	12	12
Capsicum annuum	Tn	18	0

Capsicum erwies sich als nicht geeignete Nährpflanze, und so behielt *Bac. Nicotianae* noch das Recht auf einen eignen Namen bei. Was jedoch Stamm Tn nicht kann, vermag vielleicht ein anderer, und um gegenüber dem japanischen *Bac. solanacearum* sicher zu sein, wurden zugleich mit Capsicum auch wieder Tomaten mit denselben Stämmen infiziert.

Infizierte Pflanze.	Stamm.	Anzahl Infiziert.	Anzahl Kranke.
Capsicum	Ab T_1 T T T	5	0
Tomate	„	2	2
Capsicum	Tk T T T	4	4
Tomate	„	2	2
Capsicum	Tn M [1]	5	5
Tomate	„	3	3
Capsicum	Ts	5	5
Tomate	„	2	2

Also: Capsicum ist die widerstandsfähigste von allen, aber einige Stämme vermögen sie doch anzugreifen.

Kurz gefasst, meine Infektionsversuche haben bewiesen, dass:

1. *Bacillus solanacearum* in der Kultur oft die Virulenz verliert,

2. der Verlust der Virulenz nicht für alle empfindlichen Arten gleich schnell eintritt,

3. derselbe Stamm, der im Stande ist Tabak, Tomate, Indigo, Mucuna und Sesam, aber nicht Capsicum krank zu machen, letzteres wohl vermag nach Überimpfung in Mucuna,

1) M geimpft in und isoliert aus Mucuna spec.

4. andere aus Tabak isolierte Stämme sofort die Capsicumpflanzen befallen,

5. *die Variabilität der Virulenz in Bezug auf die genannten Pflanzen bei den Deli-Stämmen so gross ist, dass die Artmerkmale von Uyedas Bac. Nicotianae und solanacearum beide zwischen ihren Grenzen liegen.*

In einer Hinsicht kann man noch Bedenken hegen. *Bac. Nicotianae,* der Capsicum und Tabak anzugreifen wusste, konnte die Eierpflanze und Tomate nicht krank machen, und eben diese beiden scheinen am leichtesten befallen zu werden, denn ausnahmslos hatten alle meine 65 Impfversuche positiven Erfolg. Diese Tatsache braucht jedoch noch nicht notwendig mit *Uyedas* Mitteilung im Widerspruch zu sein; dies wäre wohl der Fall, wenn er mit einer Bakterienkultur zu gleicher Zeit alle seine Infektionen gemacht hätte. Aber wo er weder von Stämmen noch von Zeitpunkten spricht, bleibt noch immer die Möglichkeit offen: *a.* er hätte mit verschiedenen Stämmen experimentiert, *b.* die Impfversuche mit Eierpflanze und Tomate fänden später statt als die mit Capsicum und Tabak und unterdessen wäre Verlust der Virulenz eingetreten.

In der „Diagnose des *Bac. Nicotianae*" [1]) findet man: „Impfversuche auf Physalis minimum, Capsicum longum, Amarantus gangeticus und Polygonum tinctorium fielen positiv, aber bei Solanum melongena, Lycopersicum esculenta, und Physalis Alkekengi negativ aus."

Uyeda hat also schon gefunden, dass der Bacillus der Tabakwelkkrankheit auch gefährlich sein kann für Pflanzen aus anderen Familien als aus derjenigen der Solanaceae. Und so ist es sehr wohl möglich, dass derselbe Bacillus mehr oder weniger gut beschrieben unter anderen Namen

1) l. c. S. 54.

bekannt ist. Da meine *Bac. solanacearum*-Stämme auch *Sesamum* anzugreifen vermögen halte ich es nicht für unmöglich, dass derjenige der beiden Krankheitserreger des Sesamum, welchen Malkoff[1]) als *Bacillus Sesami* beschrieben hat, mit *Bac. solanacearum* Smith identisch ist. Die wenigen kulturellen Eigenschaften, welche er mitteilt, wie das Nichtverflüssigen von Gelatine und das Verhalten mit Milch, sind wenigstens mit dieser Annahme nicht im Widerspruch.

Wer aber des Vorworts zum zweiten Bande Migulas[2]) gedenkt, erwartet nicht dass bald alles berichtigt werden kann. Aber auch wenn ein anderer Autor Prioritätsrechte geltend machen sollte, so ist jetzt der von Smith gegebene Name allgemein eingebürgert, und das Bakterium ist, leider, fast überall bekannt.[3])

Was schliesslich die Zeit anbelangt, nach welcher in Kultur die Virulenz verloren geht, so ist sie sehr verschieden: oft ist das schon der Fall binnen einigen Wochen, aber der Stamm Ti aus einer mehr als drei Monate alten

1) **Malkoff, Konstantin.** Eine Bakterienkrankheit auf Sesamum orientale in Bulgarien. Centrb. f. Bakt. Abt. II Bd. XI, 1904 S. 333, und: Weitere Untersuchungen über die Bakterienkrankheit auf Sesamum orientale. Centrb. f. Bakt. Abt. II. Bd. XVI, 1906. S. 664.

2) **Migula:** „Das Schlimmste war aber, dass von ungefähr 600 Kulturen, die ich nach und nach bekommen hatte, nur ein kleiner Teil den Originalbeschreibungen wirklich entsprach, die meisten Arten jedoch entweder falsch bestimmt waren, oder sich in langjähriger Kultur so in ihren kulturellen Eigenschaften verändert hatten, dass sie mit der ursprünglichen Beschreibung nicht im mindesten mehr übereinstimmten".

3) **Sorauer, P.** Handbuch der Pflanzenkrankheiten. **Bancroft, Keith.** A bacterial disease of potato and tomato. Agr. Bull. of the Straits and Federated Malay States. Vol IX. p. 478. 1910. **Petch, T.** Tropical Agriculturist. Vol. XXXIII, No. 6. Dec. 1909.

verflüssigten Gelatinekultur zeigte auf Tabak sehr deutlich, dass er seine Virulenz behalten hatte und später habe ich denselben Stamm noch zweimal überimpfen können bis Ti T_1 T_2 T_1. So habe ich ihn, nochmals auf Tabak geimpft, in und mit diesem aussterben lassen.

Meistenfalls wurde infiziert mittels Bouillonkulturen, aber bisweilen auch aus Kulturen mit Asparagin, Glycocoll oder KNO_3 als N-Nahrung, 10 bis 20 Tage alt, und zwar mit positivem Erfolg.

Morphologisches.

Die von Smith und Uyeda angegebenen Abmessungen ($\pm$ 1,5 μ und 0,5 μ) und (1—1,2 μ zu 0,5—0,7 μ) stimmen zwar mit denen der Deli-Stämme überein, nur sind die Grenzen etwas weiter. In alten Kulturen sinkt die Länge bis 0,5 μ und die Form erinnert an jene kurzen eiförmigen Elemente, wie z. B. *Bac. prodigiosus* bildet, „die den Kokken viel näher stehen als den Bazillen." [1]) Die grösste Länge war 1,8 μ (Karbolfuchsin und ohne Deckglas).

In fast allen Präparaten lagen die Bakterien einzeln oder zu zweien, selten zu vieren, niemals bildeten sie bei der Kultur während zwei oder drei Monate eine kettenförmige Kolonie (Uyeda). Dies war nur der Fall mit Glycocoll- und Glucose-Nahrung, und mit diesen auch in allen Kulturen mit Wachstum. Etwas gekrümmte lange Fäden, hier und da mit rund aufgequollenen nicht mitgefärbten Individuen, waren zahlreich. Nach Überimpfen in Bouillon trat wieder die gewöhnliche Wachstumsart auf. Glycocoll und Glucose machen also für *Bac. solanacearum* in Deli dasselbe, was höherer Zuckergehalt oder Phenolzusatz bei *Bacterium coli commune* wirken. [2])

---

1) **Gotschlich. in Wassermann Bd. I. S. 34.**

2) **Pfaundler. in Wassermann Bd. II. S. 341.**

Für meinen Zweck müssen Kapseln, Sporen und die Färbung nach Gram näher betrachtet werden.

KAPSELN. Das Vorkommen von Kapseln kann für die Deli-Stämme nicht bestätigt werden. Auch nach einer Kultur von zwei bis drei Monaten in Agar konnte ich weder mit Karbolfuchsin noch mit der Friedländerschen Methode Kapseln nachweisen. Auch Smith spricht nicht von Kapseln (wenigstens werden sie nicht in der Beschreibung von Migula erwähnt). Die Kapselnbildung bleibt also vorläufig ein Argument für eine gesonderte Art *Bac. Nicotianae*.

SPOREN. *Bac. Nicotianae* soll in nährstoffarmen Kulturen Sporen bilden, *Bac. solanacearum* bildet keine. Leider teilt Uyeda nicht mit, wie er die Sporen nachgewiesen hat. Abgesehen von der Keimung spricht er weder von Färbung noch von Prüfung auf Temperatur-. und Trockenwiderstandsfähigkeit.

Für die Deli-Stämme hatte Sporenfärbung mit Karbolfuchsin und Methylenblau niemals positives Resultat, auch nicht nach Beizen mit chromsaurem Kalium.

Auch die geringe Widerstandsfähigkeit gegen höhere Temperaturen macht das Vorhandensein von Sporen nicht wahrscheinlich. Von den Stämmen Ab T_1 T_1, Tc T_1 T_2 T_1, Tf T_1, Tg T_1, Th T_1 wurde je eine 16 Tage alte Glycocoll-Glucose-Kultur während zwei Minuten in Wasser von 80° C. gehalten. Dann wurden die Kulturen in 3 Minuten von 80° C. bis 40° C. abgekühlt und aus jeder Kultur impfte ich drei Reagenzgläser mit Peptonbouillon. Wachstum blieb völlig aus.

Eine Wiederholung dieses Versuches mit 66 Tage alten Bouillonkulturen von 4 Stämmen hatte ganz denselben Erfolg. Die Kulturen wurden eingetaucht in Wasser von 92° C., das nach zwei Minuten bis 83° C. abgekühlt wurde.

Als nach 3½ Minuten die Temperatur bis 40° gefallen war, und von jeder Kultur drei neue angelegt wurden, blieben alle zwölf steril, während doch von vier unmittelbar vor dem Erhitzen geimpften Röhrchen der Bouillon schon am nächsten Tag getrübt war.

Schliesslich zeigten sich 15 Fliesspapierschnitzel, geimpft aus 5 Kulturen von 5 Stämmen, 26 Tage alt, nach Austrocknen in sterilen Petrischalen im Thermostaten bei 36° C. während 45 Stunden, bei Übertragung in Bouillon alle steril, sodass bestimmt keine Sporen vorhanden waren.

„Auf festem Nährsubstrat oder in nährstoffarmen Lösungen werden die Sporen nach etwa einem Monat gebildet", sagt Uyeda. Alte Agarkulturen von fast 3 Monaten enthielten jedoch keine Sporen. Weiter findet man bei Gotschlich[1]):

„In allen diesen Fällen ist est der *eintretende Nährstoffmangel,* nicht etwa eine von vornherein kümmerliche Ernährung, welche die Sporenbildung begünstigt; vielmehr ist die Sporenbildung um so reichlicher, je besser vorher die Ernährung war; unter von vornherein ungünstigen Bedingungen wird die Sporenbildung sehr in Frage gestellt und bleibt eventuell ganz aus (Schreiber). Hiermit wird auch der scheinbare Widerspruch behoben, in dem die Versuche Lehmanns und Osbornes gegen die soeben dargelegte Theorie Buchners stehen, indem beide Autoren fanden, dass die absolute Zahl der Sporen und auch ihr Verhältnis zur Anzahl der vegetativen Keime um so grösser ist, je besser der Nährboden war."

Dieser Ausspruch macht die Richtigkeit der Mitteilung Uyedas etwas fraglich, ebenso wie die an den Deli-Stämmen oft sehr gut wahrnehmbare

1) **Wassermann. Bd. I. S. 119.**

Polfärbung, die von Kulturen in nährstoffarmen Lösungen meistenfalls sehr deutlich ist. Weniger gut zu sehen sind die Polkörner in Präparaten aus Peptonbouillonkulturen. Auch an frischem Material, sofort aus Tabak, ist die Polfärbung leicht zu konstatieren.

Weil Uyeda meint Sporenbildung wahrgenommen zu haben, habe ich die Färbung so vorgenommen, dass bestimmt keine Sporenfärbung mich täuschen konnte, sowohl nach Fixation in der Flamme als mittels Alkohols, und gefärbt mit Löfflers Methylenblau, Karbolfuchsin nach Ziehl—Neelsen, unverdünnt während einiger Sekunden oder zehnfach verdünnt während einer Minute, mit 0,01 % wässeriger Methylenblaulösung während 5 bis 30 Minuten. Nicht immer war die Polfärbung ganz klar.

Färbung der Polkörner nach Fixation mit Alkohol.

Stamm.	Nährstoff.	Karbolfuchsin.	Methylenblau.
Aa	Peptonbouillon	—	±
„	Peptonwasser	—	—
Ab	Peptonbouillon	±	— bis ±
„	Peptonwasser	+	±
Tb T_1	Peptonbouillon	—	—
„	Peptonwasser	—	± bis +
„	Tyrosin	+ bis + +	+ bis + +
Tc T_3	Peptonbouillon	—	±
„	Peptonwasser	— bis ±	—
Td	Peptonbouillon	+ +	+ +
„	„ [1]	+ +	+ +
„	„ [1]	+ +	+ +

1) Eine andere Kultur.

Färbung der Polkörner mit Karbolfuchsin nach Fixation in der Flamme.

Stamm.	Nährboden.	Alter.	Pol-Färbung.
Tc T_1 T_2 T_1 T_1 T_1	Peptonbouillonagar	77 Tage	±
Te	„	42 Stunden	— bis ±
Tf	„	42 „	— bis ±
Tg	„	18 „	+
„	„	42 „	— bis ±
Ph(ysalis)	„	—	+
„	KNO_3 und Glucose	einige Tage	+ +
„	„ „ Saccharose	„ „	+ +
To	Peptonbouillon	6 „	+
Tq	„	10 „	+
Te	Frisch aus Tabak		+
Tn	„ „ „		+ +
Bb T [1])	Peptonbouillon	24 Stunden	—
Bc T	„	3 Tage	+ +
Taa	„	3 „	+ +

In den mit ± bezeichneten Fällen waren die Polkörner kaum sichtbar, mit + gut, mit + + sehr deutlich wahrnehmbar (mit fast ungefärbtem Mittelteil). Mit Ausnahme des Stammes Td war die Färbung am deutlichsten bei Kulturen aus Tyrosin- oder KNO_3-Lösung; das war in Kulturen mit langsamerem Wachstum.

Ohne dazu berechtigt zu sein die Mitteilung Uyedas in Abrede zu stellen, muss ich doch fragen: konnte nicht

1) Stämme aus *Acalypha boehmerioides* sind in den Tabellen mit B angedeutet.

vielleicht die Angabe sich gründen auf die Polfärbung? Man denke an den Typhusbacillus bevor Buchner die Polfärbung festgestellt hatte. Uyeda hat auch nicht den geringsten Beweis geliefert, dass er wirklich mit Sporen zu tun habe, und so bleibt ein sonst wichtiges Argument für die Sonderung einer neuen Art doch fraglich.

GRAM'SCHE METHODE. Auf demselben Glas mit *Diplococcus enteritis* (positiv) und *Bact. coli* (negativ) untersucht, zeigten sich die Deli-Stämme Gram-negativ, wie Uyedas *Bac. solanacearum* [1]), aber abweichend von seinem *Bac. Nicotianae*, den er positiv nennt: „schwach schwarzblau oder rot." Meiner Ansicht nach ist das doch nicht stark ausgesprochen positiv. Hat er beide Bakterien-„Arten" zugleich untersucht? Ich bin nicht davon überzeugt, dass die Resultate der Gramschen Methode hier auf einen Artunterschied deuten.

GEISSELN. Noch eher als die Virulenz scheint die Beweglichkeit verloren zu gehen. Oft war der Bacillus in einer 24 Stunden alten Peptonbouillonkultur ohne eigne Bewegung, ebenso von Agarkulturen in Wasser oder Bouillon übertragen, auch wenn die Agarkulturen weniger als 24 Stunden zuvor angefertigt waren. Frisch aus Tabak untersucht bekommt man ebenfalls meistens den Eindruck einen unbeweglichen Bacillus vor sich zu haben, was eine Auslese meiner Notizen zeigen mag:

1) Beim Fehlen dieses Merkmals in der Literatur hat Teisi Matzuschita *Bac. solanacearum* zu den Gram-positiven Bakterien gezählt in seiner Bakteriologischen Diagnostik, No. 697. S. 302. 1902.

STAMM.	NÄHRBODEN.	ALTER DER KULTUR.	BEWEG-LICHKEIT.
Tc T_1	Peptonbouillon	21 Tage	—
Td	Frisch aus Tabak	0 „	—
„	Peptonbouillon	1 „	+
Te	Frisch aus Tabak	0 „	—
Tg	„ „ „	0 „	—
„	Peptonbouillonagar	18 Stunden	—
„	„	2 Tage	—
Ph(ysalis)	„	18 Stunden	—
„	„	2 Tage	—
BbT(Acalypha)	Peptonbouillon	24 Stunden	+
Taa	„	24 „	+
Tdd	„	2 Tage	—

Die Brownsche Bewegung ist sehr lebhaft. Einmal konnte ich in einem Querschnitt eines kranken Tabakstengels an den Bakterien gar keinen Unterschied der Beweglichkeit wahrnehmen vor und nach Zusatz von Jod, wodurch die Bacillen braun gefärbt wurden.

Doch ist die Geisselfärbung einige Male gelungen (nach van Ermengem) und zwar mit demselben Resultate das Uyeda bekam: der Bacillus besitzt mehrere peritriche Geisseln, welche 3—4 mal so lang sind wie der Bacillus selbst. Leider habe ich an den einzeln liegenden Bacillen niemals mehr als drei Geisseln gesehen, immer waren viele abgefallen. Wenn jedoch, was sehr oft der Fall war, einige Bacillen mit den Geisseln in einander verschlungen waren, zeigte sich, dass die Anzahl grösser war. Uyedas Ausspruch: „Es scheint mir, dass in vielen Fällen *Bacillus Nicotianae* 4—8 Geisseln besitzt", gilt ungeändert für *Bacillus solanacearum*.

PHYSIOLOGISCHES.

Meistenfalls arbeitete ich mit etwa 10 Stämmen zugleich, die immer nach einigen Wochen aufs neue in jungen Tabak übergeimpft wurden mit dem Zweck die Virulenz zu behalten und immer gut vergleichbares Material zur Verfügung zu haben. Zeigte sich Verlust der Virulenz, so führte ich den Stamm ab.

Auf diese Weise habe ich im Laufe der Untersuchung fast alle Stämme verloren.

Bouillon. Peptonbouillon (1 % Liebig's Fleischextrakt und 1 % Pepton „Witte" ohne Alkalisierung oder neutralisiert) trübt sich nach 12—24 Stunden ziemlich gleichmässig im Anfang, erst später am stärksten in den oberen Schichten. Ein Häutchen bildet sich meistens nach einigen Tagen, wie bei Uyedas *B. Nicotianae*, aber es gibt auch Stämme, z. b. Ts und Tv, welche sich wie sein *B. solanacearum* benehmen, d. h. das Häutchen entsteht erst nach 1—2 Wochen, und ist dann noch äusserst dünn. Mit Glucose wird es immer dick.

Auch die Deli-Stämme färben oft die Lösung braun, nicht alle Stämme aber gleich stark. Eine Serie von 36 Kulturen, von jedem Stamme 3, zeigten typische Unterschiede: die Kulturen von Tc T_1 T_2 T_1 T_1 wurden schon nach etwa 3 Wochen braun, aber nicht sehr dunkel, ebenso die von Tc T_1 T_2 T_1 Sm.,[1]) Ab T_1 T_1 T_1 und Tj T_1 T_1 färbten die Lösung dunkel-Kaffeebraun, die übrigen Kulturen färbten sich ganz wenig. An weit über 200 Bouillonkulturen habe ich niemals einen schwarzen Ring um das Häutchen gesehen, wohl aber bei allen älteren Kulturen einen grauweissen Bodensatz.

1) **Sm, Stamm geimpft in *Solanum melongena* und aus dieser wieder isoliert.**

G e l a t i n e. Das Verhalten der Deli-Stämme auf (neutraler) Gelatine ist etwas anders als U y e d a mitteilt, und stimmt mehr überein mit dem Verhalten seiner Kultur von *B. solanacearum*, welche viel langsamer verflüssigt als *B. Nicotianae*. Die Ursache dieses langsamen Verflüssigens kan vielleicht auch der hohe Schmelzpunkt meiner Gelatine sein, nämlich 31°—33° C. bei Verwendung von 10 % Gelatine „Non plus ultra" von Gehe & Co., Dresden. „Nach etwa 3 Wochen wird die ganze Gelatine verflüssigt, und allmählich ziemlich grauschwarz gefärbt," sagt U y e d a von seinen Stichkulturen. Für meine Stichkulturen war in fester Gelatine (32—33° C.) Verflüssigung nach einem Monat schon ziemlich schnell, und die meisten brauchten etwa 2—2½ Monate dazu, einige sogar mehr als 3 Monate. Unter etwa 3 c.m. Paraffinöl war nach 3½ bis 4 Monaten noch nicht alles verflüssigt.

Grossen Einfluss hat der Schmelzpunkt, der auch bei ganz gleicher Behandlung doch immer für jede Anfertigung etwas verschieden ist. Immer war die Gelatine mit hohem Schmelzpunkt, ± 33° C., die widerstandsfähigste und nur diese färbt sich schwarz, die Gelatine von weicherer Konsistenz wird oft, aber nicht immer, mehr oder weniger braun. Dies bezieht sich auf 58 Gelatinestichkulturen von 15 Stämmen, und die Variabilität, sogar für Kulturen von einem und demselben Stamm, ist nicht so gering, dass der von U y e d a gefundene Unterschied zwischen seinem *B. Nicotianae* und seinem *B. solanacearum* nicht innerhalb dieser Grenzen läge. (Die Zeit für seinen *B. solanacearum* war nämlich für Strichkulturen binnen 5 oder 6 Wochen, und dann noch schwach; dagegen binnen 2 Wochen für *B. Nicotianae*, also etwa dreimal so langsam. Leider hat er keine Stichkulturen des *B. solanacearum* gemacht).

Nur dann wird der von U y e d a gefundene Unterschied

einigen Wert haben, wenn er sich konstant zeigt, auch wo von jeder „Art" viele Stämme untersucht werden.

Agar. Im Anfang bekam ich mit 1% Pepton und 1% Bouillon niemals schwarze Agarkulturen, wie Uyeda sowohl für *B. Nicotianae* als für *B. solanacearum* angibt. Immer wurden die kulturen nur braun, oft sogar nicht mehr als gelblichgrau gefärbt, bis auf einmal der Stamm Tk, als Tk T_1 T_1 in Strichkultur nach 16 Tagen das Agar schwarz zu färben anfing, ganz wie die Figur 16 Uyedas, und nach 2 Monaten war dieser Stamm der einzige unter 8 zu gleicher Zeit gemachten Kulturen. Von den 8 Strichkulturen von denselben 8 Stämmen und von demselben Agar wurden keine schwarz, auch nicht der Stamm Tk T_1 T_1. Später schwärzte auch der Stamm T× das Agar.

Kartoffeln. Statt grauschwarz färben die Delistämme die Kartoffelscheiben violettschwarz, sonst gab es keine Unterschiede von den Angaben von Smith und Uyeda über ihre Bakterien. Die vierprozentige Glyzerinlösung, über welcher die Kartoffelscheiben auf einem kurzen Glasstabe ruhen, wird oft braun gefärbt.

Milch wird nach Smith[1]) „seifig, stark alcalisch, das Casein wird nicht gefällt".

In seiner vorläufigen Mitteilung sagt auch Uyeda[2]): „saponifies milk", aber in der ausführlichen Arbeit[3]): „Milch wird anfangs koaguliert aber das Koagulum allmählich gelöst und peptonisiert". Diese beiden Angaben Uyedas stimmen nicht ganz genau. Fügt man noch seinen Befund für *B. solanacearum*: „Milch wird weder peptonisiert noch

1) Migula. W. Das System der Bakterien II S 775.
2) Bakt. Centrb. XIII, 1904. S. 329.
3) l. c. S. 47 und 53.

koaguliert" hinzu, so gibt es vier Angaben, von welchen nicht zwei völlig mit einander übereinstimmen.

Milch, frisch in Medan gekauft (von der Zebu) blieb nach Impfung mit 14 Tabakstämmen, 3 Stämmen aus *Acalypha boehmerioides*, 2 aus *Ageratum conyzoides* und 1 aus *Physalis angulata*, also mit 20 Stämmen in 91 von den 95 Kulturen, ungefähr amphoter oder wurde schwach alkalisch. Nur 4 von den 6 Kulturen von Ti zeigten Fällung des Caseins unter Säurebildung, aber erst nach 7 Wochen. Im Gegensatz dazu koagulierten 9 Stämme alle 63 Kulturen mit „Natura"-Milch (Sterilisierter Milch von der Exportgesellschaft Bosch & Co, Waren, Mecklenburg), mit oder ohne Lakmus oder Methylenblau, aber nach 2 Monaten fehlte noch jede Spur von Peptonisierung. Mit Lakmus zeigte sich das Verhalten in geradem Gegensatz zu dem des Bacillus Uyedas, denn zuerst wurde nach durchschnittlich 3 Tagen die Farbe der oberen Schichten blau, und wieder 3 bis 4 Tage später änderte sich die Reaktion in eine saure. Der Farbenwechsel fängt immer oben an (Sauerstoffbedarf!) und niemals schreitet die Reduktion völlig bis oben fort, ebenso wenig wie mit Methylenblau.

Weil von diesen 9 Stämmen 8 zu den 20 erstgenannten gehörten, wäre es möglich, dass die Ursache dieser kulturellen Unterschiede in den besondern Eigenschaften der verwendeten Milch zu finden wäre. Darum wurde auch andere Milch von verschiedenen Fabriken dem Bacillus geboten und es zeigte sich ein Unterschied zwischen den Kulturen mit europäischer und mit der immer dickeren indischen Milch, welchen ich nicht zu erklären vermag. Uebersichtlich neben einander sieht man die Ergebnisse in der Tabelle:

MILCH.	ANZAHL STÄMME.	ANZAHL KULTUREN.	ZUERST ALK.	SPÄTER SAUER.	KOAG.
Von der Zebu	20	95	—	4	4
Nutricia [1]	8	24	—	—	24
„ mit Lakmus	8	24	24	24	24
Landbouw [2] „ „	10	30	30	27	27
Milkmaid [3] „ „	11	33	33	26	26
Natura ohne „	9	26	—	—	26
„ mit „	7	20	20	17	17
„ „ Meth.bl.	6	17	—	—	17

Die 3 Kulturen vom Stamme Te T_1 T_l welche nicht zur Säurebildung gelangten, hatten 12 Tage vorher schon das schwache Vermögen dazu zu erkennen gegeben mit „Natura"-Milch. Statt 6 bis 7 Tage dauerte es 11 bis 13 bevor die Kulturen mit Lakmus von blau nach rot umschlugen. Auch eine Kultur von Tm T_1 und alle drei von Tn zeigten den Farbenwechsel nicht. Letzterer, Tn, war ein Stamm, der ziemlich schnell seine Virulenz verloren hatte. Die drei Kulturen mit Landbouw-Milch und Lakmus, welche alkalisch blieben, waren vom Stamme Tc T_1 T_2 T_1 T_l T_3.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, dass:

1. Mit frisch gekaufter Milch die Deli-Stämme in der Regel weder koagulieren noch peptonisieren (nur 4 Ausnahmen von einem Stamme unter 95 Kulturen).

2. Mit sterilisierter europäischer Milch alle Stämme anfangs die Milch alkalisch machen.

1) **Nutricia. Zoetermeer—Holland.**

2) **Landbouw. 's Gravenhage—Holland. (Milch in Flaschen).**

3) **Milkmaid. Anglo-Swiss condensed Milk Co. Sterilized natural milk. Alle drei sollen ohne Desinfectantia sterilisiert sein.**

3. Die abgeschwächten Stämme in diesem Stadium stehen bleiben, die übrigen aber allmählich anfangen den Zucker zu vergären und Säure zu bilden.

No. 1. entspricht dem Verhalten des *Bac. solanaçearum* in Uyedas Kulturen.

No. 2. ist in Übereinstimmung mit den Smithschen Angaben über denselben Bacillus. Die Farbe ist gehörig blau, aber ohne Ziffer ist „stark" ein relativer Begriff.

No. 3. ist im Widerspruch mit allem, was man über *Bac. solanacearum* berichtet hat, gerade das Gegenteil dessen, was Uyeda mitteilt von seinem *Bac. Nicotianae.*

Weil drei verschiedene Resultate sich zeigen, abhängig vom Alter der Kultur, woraus die Milch geimpft wird, anderseits auch von der Zusammensetzung der Milch, mag es sein dass der japanische Bacillus sich etwas anders benimmt als die Deli-Stämme, (was also Uyeda berechtigen würde seinen Bacillus als einen neuen zu betrachten). Die Möglichkeit ist jedoch allerdings nicht ausgeschlossen, dass er mit „Nutricia", „Landbouw"-, „Natura"- oder „Milkmaid"- Milch dieselben Resultate bekäme wie ich mit den Deli-Stämmen.

Am besten schliessen sich die Kulturen in Lakmusmolke und Barsiekow A, B und C an, wie diese (nebst „Rothberger", Milch und Kartoffel) verwendet werden für die Coli- Dysenterie- Typhus- Gruppe. Das Wachstum war ausserordentlich langsam, wie mit fast allen Nährmedien ohne Pepton. Die Nutroselösungen — (die Natriumverbindung von Casein) — mit Glucose, Mannit und Lactose sind keine geeigneten Nährsubstanzen. Die Resultate waren:

STAMM.	Te.	Ab T_1.	Ph.
Rothberger .	ungeändert	ungeändert.	ungeändert.
Lakmusmolke	alkalisch	alkalisch.	alkalisch.
Barsiekow A	sauer, koag.	sauer, koag.	sauer, koag.
„ B	„ „	„ „	„ „
„ C	kein Wachstum.	kein Wachstum.	kein Wachstum.

Die Änderung der Reaktion in Lakmusmolke und Barsiekow A und B wurde erst nach etwa einer Woche sichtbar. Aus den Barsiekow-C-Kulturen konnte nach 14 Tagen noch der Bacillus in Peptonbouillon zum Wachstum gebracht werden.

Das Sauerstoffbedürfniss zeigt sich durch das bedeutend langsamere Wachstum unter Paraffinöl, durch die Form der Gelatinestichkulturen, durch ein langsameres Wachsen im geschlossenen Röhrchen der Gärungskolben als im offenen kugelförmigen Teil, und durch das verlangsamte Wachstum im Botkins-Apparate.

Methylenblaureduktion. Von 92 Bouillonkulturen, worin 0,002% Methylenblau, waren nach 1 Tag 0, nach 2 Tagen 31, nach 3 Tagen 71, nach 5 Tagen 85, nach 10 und auch noch nach 14 Tagen 87 Kulturen entfärbt mit Ausnahme der oberen drei bis vier Millimeter. Diese 92 Kulturen waren geimpft mit 9 Stämmen aus Tabak, 2 aus Ageratum, 1 aus Blumea.

Drei Stämme, resp. aus Tabak, Mucuna und Blumea, entfärbten je 3 Kulturen Glucosebouillon mit 0,002% Methylenblau binnen einem Tage.

Die 5 Kulturen, welche nach 14 Tagen noch nicht ent-

färbt waren, gehörten alle zum Stamme Ti, 4 von diesen waren damals auch schon 2 Monate in Kultur.

Unter Paraffinöl (zuvor erhitzt und schnell abgekühlt) ist der Sauerstoffzutritt bedeutend erniedrigt, aber dadurch auch das Wachstum gehemmt. Letzteres ist für die Reduktion merklich schädlicher als der Sauerstoffabschluss förderlich ist, denn von den 32 Kulturen (5 Stämmen) waren nach 14 Tagen 19 noch nicht entfärbt. Für die Reduktion in Milch siehe unter Milch.

Reduktion von Natriumselenit. Um die Bakterienarten auf Reduktion des Selenits zu untersuchen, rät v. Hall 0,05 bis 0,1 % zu verwenden, selbst nimmt er 0,05 %. Als ich anfing mit 0,1 % $Na_2 Se O_3$ zeigte sich nach einigen Tagen in den Agarstichkulturen (Peptonbouillonagar) kein Wachstum, sogar nicht an der Oberfläche. Nur der Stamm Ab $T_1 T_1 T_1 T_1$ liess nach 10 Tagen in zwei von den drei Kulturen eine Spur von Wachstum sehen und einige steinrote Flecken. Von den anderen 12 Kulturen von 4 Stämmen zeigten nach 3 Wochen die drei Kulturen von Tq schwache Entwicklung, binnen einem Monat noch 2 vom Stamm To, weiter brachten sie es nicht. Dagegen verursachten 4 Stämme (Ab $T_1 T_1 T_1 T_1$, Tk $T_1 T_1 T_1$, TnM und Ts) in 12 Kulturen mit 0,01 % Selenit schon nach zwei Tagen deutliches Wachstum und Reduktion. Die Konzentration des Selenits muss also für unsren *Bac. solanacearum* bedeutend erniedrigt werden. Die hemmende Wirkung des Selenits hat vor kurzem Korsakow [1]) auch für die Ausscheidung der Kohlensäure durch Hefe konstatiert.

1) **Korsakow, Marie. Ueber die Wirkung des Natriumselenits auf die Ausscheidung der Kohlensäure lebender und abgetöteter Hefe. Ber. d. d. Bot. Ges. Bd. 28, 1910. S. 334—338.**

Reduktion von Nitrat. Die wichtige Eigenschaft Nitrat reduzieren zu können, prüft van Hall [1]) dadurch dass er an Agarkulturen mit 0,2 % Amylum und 0,1 % KNO_3 mittels Jodkalium und Salzsäure auf Nitrit reagiert. Indem ich auf diese Weise untersuchte, bekam ich immer negative Resultate. Auch die Meyersche Lösung anorganischer Salze mit Stärke und Kalisalpeter zeigte niemals eine Spur von Wachstum in 46 Kulturen von 9 Stämmen, auch nicht nach 2 bis 3 Wochen. Die für andere Bakterien hinreichende Methode lässt uns für die Deli-Stämme des *Bacillus solanacearum* im Stiche, weil diese auch die Stärke slecht ausnutzen. Mit Glucose, Saccharose und vielen anderen C-Quellen kann der Bacillus mit KNO_3 als Stickstoff-Quelle auskommen, und in allen untersuchten Fällen konnte mehr oder weniger deutlich auch das Vorhandensein des Nitrits mit Jodkali-Stärkekleister-Papier bewiesen werden.

Diastasebildung. Die Methode, welcher van Hall folgte, mit KNO_3 gibt, wie schon erwähnt ist, für das Bakterium der Tabakwelkkrankheit in Deli negative Resultate. Auch die Methode Meyers [2]) — (der von je zwei Kulturen eine aufkocht um eventuell vorhandene Diastase zu vernichten und dann beide mit steriler Stärkelösung und einigen Tropfen Toluol mischt, um nach 24 Stunden mit Jod zu untersuchen, ob die nicht erhitzte Kultur stärkeärmer ist als die andere) — hatte keinen positiven Erfolg mit 6 Stämmen. Das stimmt mit dem was Smith [3])

1) l. c. S. 156. (Nach Beyerinck. Centrbl. f. Bakt. Abt. II, I, 1895. S. 58).

2) Gottheil, O. Botanische Beschreibung einiger Bodenbakterien. Centrbl. f. Bakt. Abt. II, Bd. VII. 1901. S. 463.

3) Smith, Erwin F. Entgegnung auf Alfred Fischers „Antwort". Centrbl. f. Bakt. Abt. II. Bd. VII. 1901. S. 136.

gefunden hat: „Die Stärkekörnchen scheinen durch diesen Organismus nicht angegriffen zu werden" und „dieser Organismus hat offenbar nur sehr schwache diastatische Wirkung". Dagegen meint Uyeda: „Auch eine sehr geringe Menge von Diastase scheint er auszuscheiden." Einen bestimmten Widerspruch kann man darin noch nicht sehen.

Tyrosinasebildung. Alle meine acht darauf untersuchten Deli-Stämme konnten mit Tyrosin zum Wachstum gelangen, sei es auch weniger schnell als mit Peptonwasser. Schwärzung blieb jedoch völlig aus in allen 34 kulturen. [1]

„Wenn man eine 1—5 % ige Tyrosinlösung zu einer Bacillenkultur gibt, so nimmt sie rascher eine rotschwarze Farbe an, als ohne jenen Zusatz," sagt Uyeda. Ein solcher Versuch mit einer Bouillonkultur fiel negativ aus; allerdings war jedoch die Konzentration der Tyrosinlösung eine geringere. Nach Erlenmeyer [2]) löst ein Teil Tyrosin sich bei 20° in 2454 Tln. Wasser und bei Siedehitze in 154 Tln. Wasser [2]). Ohne weiteres (Ammoniak oder Alkalien?) hat Uyeda seine Lösungen wahrscheinlich nicht hergestellt.

Fett. Weder mit Osmiumsäure noch mit Sudan III ist es mir gelungen das vorhandensein von Fett zu konstatieren.

Glycogen war ebensowenig wie Fett in Peptonbouillonkulturen zu finden (mit Jodjodkali).

Indol. *Bac. Nicotianae* weist eine schwache Indolreaktion auf bei den Kulturen in Peptonlösung, *Bac. solanacearum* keine Indolreaktion. Mit beiderlei Verhalten zeigen

1) Siehe für Tyrosinabbau ohne Homogentisinsäurebildung durch Bakterien: Czapek Biochemie der Pflanzen. Bd. II, S. 91 und 559.

2) Beilstein. Bd. II, S. 1567.

die Deli-Stämme Übereinstimmung, denn in 22 Kulturen (von 9 Stämmen) fiel die Reaktion nahezu negativ aus. Als die Kulturen nach dem Zusetzen von Schwefelsäure und Kalinitrit aufgekocht wurden, entstand eine nach Abkühlung bleibende rote Farbe in 20 von den 25 Kulturen (von 10 Stämmen). Diese bildeten eine Reihe von einer langsam abnehmenden Intensität der roten Farbe. Konstante Stammesunterschiede gab es bei den 47 Kulturen nicht. Von demselben Stamme gleicht bisweilen eine Kultur Uyedas *Bac. solanacearum*, eine spätere (nach Überimpfen in Tabak und wieder Isolieren in Reinzucht) seinem *Bac. Nicotianae* (ein oder mehrere Beispiele lieferten die Stämme Ab, Tc, Tg, Ti).

Eine Wiederholung dieser Versuchen mit der Ehrlichschen [1]) Methode (Paradimethyl-amidobenzaldehyd und Kalipersulfat) gab für zwei Stämme aus Tabak (Tx und Taa) und ebenso für zwei Stämme aus *Acalypha boehmerioides* (Bb und Bc) in allen zehn Kulturen negatives Resultat. Die Möglichkeit ist also nicht ausgeschlossen, dass überhaupt kein Indol gebildet wird, da die Reaktion mit Kalinitrit und Schwefelsäure immer ziemlich schwach war, sowohl in jungen als in alten Bouillonkulturen, und eine schwache Rosafärbung nach Crossonini [2]) nicht immer auf Indol deutet. Auch Uyeda hat nur schwache Indolreaktion (Reagenz?) bekommen für *Bac Nicotianae.*

Schwefelwasserstoff. Wie auch Uyeda gefunden hat, ist die Bildung von Schwefelwasserstoff sehr gering. Bleiacetatpapierstreifen werden auch nach mehrtägigem

1) **Ehrlich. Ueber die Dimethylamido-benzaldehyd-Reaktion. Med. Woch. 1901. Nr 15.**

2) **Crossonini. E. Ueber den Nachweis von Indol in den bakterischen Kulturen mit der Ehrlichschen Methode. Archiv für Hygiene 1910. Bd. 72. S. 161.**

Aufenthalt über den Kulturen nicht geschwärzt. Von 18 Kulturen (9 Stämmen) war nur bei einer eine Spur am Rande des Streifens sichtbar. Beim Auskochen von 32 Kulturen (10 Stämmen) wurde an 10 Schwärzung konstatiert, jedoch nur ein kaum sichtbarer Anflug. Und alle 10 Kulturen, welche positive Reaktion auf Schwefelwasserstoff zeigten, gehörten zu Stämmen, wovon andere Kulturen negativ ausfielen.

Säure- und Alkalibildung. In allen Kulturen mit normaler Entwicklung und sogar in den meisten mit schwacher Entwicklung wird die Nährlösung nach einigen Tagen alkalisch (während sie ursprünglich immer schwach sauer war), einerlei welche C-Quelle dabei verwendet ist. Eine Ausnahme macht Milch, welche, wie schon erwähnt, anfangs auch alkalisch wird, aber bei den meisten Stämmen nachher unter Säurebildung koaguliert. Die zweite Ausnahme, wahrscheinlich aber derselben Ursache zufolge sind die Nutrosekulturen mit Glucose und Mannit. Die Zucker- und Alkoholvergärung ist offenbar stärker als der Abbau des Eiweisses der Milch und der Nutrose, (welche letzte eine Natriumverbindung des Caseins ist). Abgesehen von Milch und Nutrose stimmen die Befunde also völlig überein mit dem Verhalten des *Bac. solanacearum* Uyedas.

Gasbildung findet nicht statt in der geschlossenen Röhre der Gärungskölbchen mit Pepton-bouillon und Glucose, Saccharose oder Mannit (jedesmal versucht mit 9 Kulturen, von 3 Stämmen je 3). Meistens ist aber auch bei Sauerstoffzutritt keine Spur von Gasbildung wahrzunehmen. Sicher festgestellt habe ich sie nur an 24 Glucosebouillonkulturen, nämlich 10 Kulturen von Tabakstämmen, 7 von Physalis, 2 von Ageratum, 4 von Mucuna und 1 von Blumea. Gerade wegen dieses ungleichen Verhaltens glaube ich, dass die ganz geringe Gasbildung einiger

Stämme noch kein hinreichender Unterschied gegenüber den übrigen ist, um als Artmerkmal dienen zu können, wie Uyeda es verwendet („Bildet etwas Gas" von *Bac. Nicotianae*).

Ein unangenehmer Geruch in Peptonbouillonkulturen wird oft produziert, und zwar von einem Stamm mehr als von dem anderen, auffällig stark z. B. von Ts. Diese Unterschiede zwischen den Deli-Stämmen von derselben Bakterienart entsprechen dem Unterschied zwischen Uyeda's *Bac. Nicotianae* und seiner Kultur von *Bac. solanacearum.*

Die Widerstandsfähigkeit gegen höhere Temperatur ist schon teilweise unter „Sporen" erwähnt. Der Thermaltodpunkt soll für *Bac. Nicotianae* ca. 55° C. sein, für *Bac. solanacearum* ca. 52° C. Nur dann würden diese Zahlen einen Artunterschied bezeichnen, wenn sie den Mittelwert darstellten von vielen Versuchen mit gleich alten Stämmen in derselben Nährlösung. Die blosse Mitteilung dieser Temperaturen, welche doch nicht weit von einander liegen, ist nicht zuverlässig.

Öfters wiederholte Versuche, einmal mit vier Stämmen zugleich, wiesen aus, dass mit dem wärmeren Klima der Thermaltodpunkt doch nicht höher war als in Japan, wenigstens folgte niemals Wachstum nach Impfen aus Kulturen, welche während 10 Minuten auf 55° C. gehalten waren.

Die Widerstandsfähigkeit gegen Austrocknen ist ebenfalls schon unter „Sporen" kurz erwähnt.

Stickstoff- und Kohlenstoffquellen.

Um zu untersuchen welche Stoffe zugleich als N- und C-Quelle dienen konnten, hat van Hall diese Stoffe in Leitungswasser mit 0,25 % K_2HPO_4 gelöst.

Weil das medansche Leitungswasser ein an mineralischen Bestandteilen armes Karbonatwasser ist, habe ich für alle Versuche die Meyersche Lösung [1]) hergestellt.

Die Stoffe — (alle von Merck) —, welche nach Mercks Index nicht wasserlöslich sind, wurden gelöst mit möglichst wenig Na_2CO_3 und die, welche sowohl mit Alkali als mit Säure zur Lösung gebracht werden können, obendrein mit HCl. Die Resultate waren folgende:

WACHSTUM MIT VERSCHIEDENEN STOFFEN, WELCHE ZUGLEICH ALS STICKSTOFF- UND KOHLENSTOFF-QUELLE DIENEN KÖNNEN, IN MEYERSCHER LÖSUNG.

N- UND C-QUELLE.	ANZAHL STÄMME AUS:			ANZAHL ANGELEGTE KULTUREN.	WACHSTUM IN:
	Tabak.	Ageratum.	Physalis.		
Albumin	7	2	1	42	0
Asparagin	11	2	1	62	7
Fibrin (Blut-) alk.	7	2	1	42	0
Fibrin (Blut-) sauer	8	1	—	27	0
Gluten	8	2	1	27	0
Glycocoll	7	2	1	31	0
Guanin alk.	7	2	1	40	0
Guanin sauer	9	1	—	29	0
Hemialbumose alk.	7	2	1	40	0
Hemialbumose sauer	9	1	—	30	0
Legumin alk.	6	2	1	38	0
Legumin sauer	9	1	—	30	0
Leucin	7	2	1	42	0
Nuclein	7	2	1	41	0

1) Küster, E. Anleitung zur Kultur der Mikroorganismen. 1907. S. 146.

N- UND C-QUELLE.	ANZAHL STÄMME AUS:			ANZAHL ANGELEGTE KULTUREN.	WACHSTUM IN:
	Tabak.	Ageratum.	Physalis.		
Pepton „Witte"	5	2	1	33	33
Protein	3	2	1	30	0
Protein alk.	4	2	1	31	0
Tyrosin	5	2	1	35	34
Ammon. acetat	10	1	—	31	0
„ succinat	10	1	—	32	32
„ lactat	10	1	—	33	33
„ tartrat	10	1	—	33	30 [1]
„ citrat	10	1	—	33	30 [1]

Der einzige Stoff, der einen Unterschied zwischen den Stämmen anweist, ist das Asparagin: alle drei Kulturen von Tg und Th und eine von Td zeigten Wachstum, sei es auch ein schwaches. Alle übrigen Lösungen blieben ohne Trübung, sogar nach 14 Tagen.

Einige Stickstoffquellen, welche für sich allein kein Wachstum gestatten, können bei Darreichung von Kohlehydraten oder den Natriumverbindungen organischer Säuren mehr oder weniger gut zur Nahrung dienen. Man weiss, dass solche Kombinationen für viele Arten konstant verwendbar sind oder nicht.

v. Hall hat dergleichen Kombinationen gefunden für seine phytopathologisch wichtigen Bakterien [2] unter An-

1) In der Tartrat-Reihe fehlte der Tabaksstamm Tu, in der Citrat-Reihe Tt.

2) Nämlich: *Pseudomonas Iridis* nov. spec., *Bacillus omnivorus* nov. spec., *Bacillus atrosepticus* nov. spec. und *Pseudomonas Syringae* nov. spec.

wendung des Plattenverfahrens von Beyerinck[1]) und Wijsman.[2]) Er bringt winzig kleine Quantitäten der zu untersuchenden Kohlenstoffquelle weit von einander — (sieben Versuche in einer Petrischale von 20 cm Durchmesser auf Gelatine-Agarplatten, hergestellt mit dem Stickstoffhaltenden Stoffe und K_2HPO_4 in Leitungswasser, nach Impfung bei 40° C.). So bekommt er konstante Resultate.

Hätte ich derselben Methode folgen können, so wäre mir viel Zeit erspart geblieben. Leider ist die Gefahr für Unreinheit der Plattenkulturen in den Tropen mit den niemals völlig verschliessbaren Arbeitszimmern nicht gering, zumal wegen des langsamen Wachstums des Bacillus. Oft sind nach drei Tagen schon grosse Strecken mit Pilzen überwachsen. Dazu kommt noch die Möglichkeit, dass die Kohlehydrate u. s. w. mit Keimen verunreinigt sind. Zum Trockensterilisieren sind nicht alle geeignet. Man könnte kleine Tropfen von sterilen konzentrierten Lösungen verwenden, aber dann bleibt doch als letzte Schwierigkeit die Möglichkeit bestehen, dass für langsam wachsende Bakterien — (und das sind die Deli-Stämme des *Bac. solanacearum* oft) — das etwaige Vorhandensein ganz kleiner Quantitäten von als Nahrung verwertbaren Stoffen in dem Agar oder in der Gelatine, welche bei schnellem Wachstum gar nicht in Betracht genommen zu werden brauchen, hier irreführen könnten.

Darum habe ich alle Untersuchungen in Lösungen ausführen müssen, nach fünfmaliger Sterilisation bis 100° C., täglich einmal. Wachstum binnen 24 Stunden zeigte sich selten, z. B. in kaum 2 % der mehr als tausend KNO_3-

1) Arch. Néerl. XXIII p. 367; Ref. Centr. f. Bakt. Abt. I. Bd. VII 1890. S. 317.

2) Wijsman, H. P. De Diastase. Dissertatie. Amsterdam 1889.

Kulturen; nach 2 Tagen trübten sich mehrere Lösungen, die meisten aber erst nach 3 oder mehr Tagen; nach 10 Tagen noch sehr selten, sodass die Kulturzeit für die meisten bald auf 10 Tage eingeschränkt wurde.

Kaliumnitrat. Mit 1 % Kaliumnitrat (in der Minerallösung KH_2PO_4 1 %, $MgSO_4$ 3 % und NaCl 0,5 %, alkalisch) findet Uyeda für *Bac. Nicotianae* keine Entwicklung, weder mit 1 % Dextrose, noch mit 1 % Glyzerin, und für *Bac. solanacearum* mit Dextrose schwache Entwicklung, und normale mit Glyzerin. Vielleicht ist das in vollem Einklang mit dem Verhalten der Deli-Stämme; aus der Angabe Uyedas geht noch nicht hervor, dass er mit zwei Bakterien*arten* zu tun hat statt mit einer, denn meine Stämme Tb T_1 T_1, Tc T_1 T_1, Td und Tf verursachten kein Wachstum in einer der 12 Kulturen (3 von jedem Stamme) wie der *Bac. Nicotianae* Uyeda. Aber Tc T_1 T_2 T_1 trübte alle drei Röhrchen gleich wie auch Ab T_1, Ph, Te, Te T_1 und Tj, während von den übrigen eine oder zwei Entwicklung zeigten, also: mit Glucose verhalten die Stämme sich auch teilweise wie Uyedas *Bac. solanacearum*, oder zum Teil „intermediär", d. h. nur in einem Teil der Kulturen von einem Stamme findet Wachstum statt.

Das Wachstum bei Uyedas *Bac. solanacearum* ist mit Glyzerin besser als mit Dextrose, und eigentümlicherweise stimmt dieses Verhalten völlig überein mit der grösseren Anzahl Kulturen mit Wachstum bei Darreichung von Glyzerin als von Glucose (nämlich 44 von den 51 Impfungen gegenüber 27 von den 45).

Wie vorsichtig man sein muss, wenn nur wenige Stämme in einer geringen Anzahl Kulturen untersucht werden, lehren die Stämme Tc, Te, Tf und Tg. Te T_1 zeigte kein Wachstum in 3 Kulturen mit KNO_3 und Inulin, Te T_1 T_1 in allen drei. Tf T_1 und Tf T_1 T_1 machen dasselbe, aber mit Dextrin. Umgekehrt erfolgte Wachstum nach Impfung

mit Tg T_1 in allen drei Kulturen mit Rhamnose und Sorbit, aber in keiner einzigen mit Tg T_1 T_1. Schliesslich fiel Tc T_1 T_1 negativ aus mit Saccharose, und Tc T_1 T_2 T_1 in allen drei Kulturen positiv.

Kaliumnitrit. Auch bei Darreichung von salpetriger Säure als Stickstoffquelle folgt Wachstum, falls die Konzentration nicht zu stark ist, und mit geeigneter Kohlenstoffnahrung. Mit 1 % Glucose fand Entwicklung statt, jedesmal von 12 Kulturen von immer denselben 4 Stämmen,

mit 1 % KNO_2 in 7 Kulturen.
„ 0,1 % „ „ 12 „
„ 0,01 % „ „ 11 „

Asparagin. Mit Asparagin allein trat in 7 Kulturen (von 3 Stämmen) von den 41 Wachstum ein. Uyedas *B. solanacearum* zeigt in saurer Lösung keine Entwicklung mit Asparagin, sein *B. Nicotianae* sehr schwache. Dass dieser letztere mit Asparagin allein wachsen wollte, sei es auch sehr schwach, aber sich bei Zusatz von 1 % Dextrose wie *B. solanacearum* benahm, d. h. keine Entwicklung zeigte, hätte doch meiner Ansicht nach für Uyeda ein Fingerzeig sein müssen, dass man auch bei Bakterien die Variabilität nicht übersehen dürfte, denn erstens würde 1 % Glukose doch wahrscheinlich kein Gift sein, und zweitens hat diese in alkalischer Lösung das Wachstum des *B. solanacearum* eben gefördert.[1] Und unter Berücksichtigung meiner Delistämme muss ich wiederum fragen: Ist der von Uyeda gefundene Unterschied konstant? Wieviel Kulturen hat er angelegt, mit wieviel Stämmen hat er gearbeitet?

Von 12 meiner Stämme zeigten 8 kein Wachstum mit Asparagin und Glucose, 4 wohl, aber meistens nur in

1) l. c. S. 51.

ÜBERSICHTSTABELLE FÜR DAS WACHSTUM MIT 0,25 % KNO_3 IN MEYERSCHER LÖSUNG.

C-Quelle.	%	Anzahl Stämme aus:				Angelegte Kulturen.	Wachstum in:
		Tabak.	Acalypha.	Ageratum.	Physalis.		
Arabinose	1	9	—	1	—	44	19
Glucose	1	10	—	1	1	45	27
Laevulose	1	12	2	1	—	66	0
Mannose	1	2	2	—	—	15	11
Galactose	1	2	2	—	—	15	13
Erythrit	1	2	2	—	—	15	12
Adonit	1	2	2	—	—	15	5
Sorbit	0,2	9	—	1	—	47	38
Mannit	1	9	—	1	—	44	39
Dulcit	1	9	—	1	—	48	46
Rhamnose	0,2	9	—	1	—	42	23
Saccharose	1	10	—	1	1	62	50
Maltose	1	9	—	1	—	47	33
Lactose	1	9	—	1	—	47	38
Raffinose	0,2	9	—	1	—	52	50
Quercit	0,2	9	—	1	—	44	17
Inosit	1	2	2	2	—	15	14
Dextrin	1	9	—	1	—	43	27
Stärke	0,2	6	—	2	1	46	0
Glycogen	1	9	—	1	—	45	0
Inulin	1	9	—	1	—	48	7
Lichenin	1	2	2	—	—	15	0
Glyzerin	1	9	—	1	—	51	44
Natrium acetat	1	9	—	1	—	51	0
„ butyrat	1	9	—	1	—	52	0
„ succinat	1	9	—	1	—	39	20
„ malat	1	9	—	1	—	41	17
„ lactat	1	9	—	1	—	40	0
„ citrat	1	9	—	1	—	42	24

einem Teil der Kulturen. Von diesen 8 sich verweigernden Stämmen wurden 5 in Tabak geimpft und dann aufs neue dem Versuche mit Asparagin und Glucose unterzogen. Diesmal riefen 4 der 5 Stämme teilweise Entwicklung hervor (nämlich die Stämme Tc T_1 T_2 T_1, Tf T_1, Tg T_1, Ti T_1 in 8 von den 12 Kulturen). Ab T_1 T_1 blieb negativ wie Ab T_1.

Dieselben acht Glucose-negativen Stämme waren auch Saccharose-negativ. Fünf von diesen zeigten sich, nach „Auffrischung" wieder untersucht, alle teilweise positiv. Und wie das auch mit KNO_3 der Fall war, gelang das Wachstum in einer grösseren Anzahl Kulturen mit Saccharose als mit Glucose. Darum wurden die Versuche wiederholt mit anderer Saccharose, aber mit demselben Erfolg. (Man sehe dafür die Übersichtstabelle von Asparagin und verschiedenen Kohlenstoffquellen).

1 % ASPARAGIN IN MEYERSCHER LÖSUNG.

C-QUELLE 1 %	ANZAHL STÄMME AUS:			ANZAHL KULTUREN.	WACHSTUM IN KULTUREN.
	Tabak.	Ageratum.	Physalis.		
Glucose	10	1	1	60	17
Saccharose	10	1	1	58	22

Weil nur bei 7 von den 41 Kulturen mit Asparagin allein Wachstum eintrat, habe ich den Versuch wiederholt; ebenso mit Asparagin und Glucose, Asparagin und Saccharose. Diesmal zeigte sich von den 21 Kulturen keine einzige, welche sich trübte. Doch waren die sieben genannten Kulturen meines Wissens rein.

ÜBERSICHTSTABELLE FÜR DAS WACHSTUM MIT 1% ASPARAGIN IN MEYERSCHER LÖSUNG.

C-QUELLE.	%	ANZAHL STÄMME AUS:			ANGELEGTE KULTUREN.	WACHSTUM IN:
		Tabak.	Acalypha.	Ageratum.		
Keine	—	12	—	2	62[1])	7
Arabinose	1	6	—	1	21	0
Glucose	1	6	—	1	21	10
Laevulose	1	8	2	1	36	4
Mannose	1	2	2	—	15	9
Galactose	1	2	2	—	15	10
Erythrit	1	2	2	—	15	10
Adonit	1	2	2	—	15	8
Sorbit	0,2	6	—	1	21	16
Sorbin	0,2	6	—	1	21	18
Mannit	1	6	—	1	21	20
Dulcit	1	6	—	1	21	18
Rhamnose	0,2	6	—	1	21	10
Saccharose	1	6	—	1	21	18
Maltose	1	6	—	1	21	10
Lactose	1	6	—	1	21	9
Raffinose	0,2	6	—	1	21	16
Quercit	0,2	6	—	1	21	10
Inosit	1	2	2	—	15	10
Dextrin	1	6	—	1	21	13
Glycogen	1	6	—	1	21	0

1) Bei diesen 62 Kulturen waren auch 3 von einem Stamme aus *Physalis*.

C-QUELLE.	%	ANZAHL STÄMME AUS:			ANGELEGTE KULTUREN.	WACHSTUM IN:
		Tabak.	Acalypha.	Ageratum.		
Inulin	1	6	—	1	21	19
Lichenin	1	2	2	—	15	0
Glyzerin	1	6	—	1	21	12
Natrium acetat	1	6	—	1	21	0
„ butyrat	1	6	—	1	21	0
„ succinat	1	6	—	1	21	21
„ malat	1	6	—	1	21	21
„ lactat	1	6	—	1	21	0
„ citrat	1	6	—	1	21	12

Glycocoll. Weil nur eine ganz kleine Quantität Glycocoll vorhanden war, haben nur wenige Versuche angestellt werden können. Wegen des besonderen Verhaltens — Kettenbildung mit Glucose — werde ich die Versuche mit neuem aus Europa bestelltem Glycocoll fortsetzen.

Mit Glycocoll allein konnten die Organismen nicht auskommen; bei Darreichung von Glucose, Lactose, Maltose und Mannit tritt teilweise nach einigen Tagen Wachstum ein:

ÜBERSICHTSTABELLE FÜR DAS WACHSTUM MIT 0,1 % GLYCOCOLL IN MEYERSCHER LÖSUNG.

C-QUELLE 1 %	ANZAHL STÄMME		ANZAHL KULTUREN.	WACHSTUM IN KULTUREN.
	aus Tabak.	aus Ageratum.		
Glucose	9	1	33	13
Laevulose	9	1	49	0
Mannit	9	1	49	40
Maltose	9	1	49	32
Lactose	8	1	45	26

Auch hier gab es wieder einige charakteristische Beispiele der „Umstimmung" in Gärungsvermögen für die C-Quelle. Von je 3 Kulturen trat Entwicklung ein:

TgT_1 mit Mannit in 1 K., mit Maltose in 0 K., mit Lactose in 0 K.
TgT_1T_1 „ „ „ 3 „, „ „ „ 3 „, „ „ „ 2 „

Von 3 Kulturen von AbT_1T_1 wollte keine mit Glycocoll und Lactose wachsen, 3 andere, aus demselben Reagenzglas geimpft, taten es alle.

Ammoniakstickstoff. Dass bei geeigneter Kohlenstoff-Quelle Ammoniak als Stickstoff-Nahrung Wachstum verursacht, beweisen in erster Linie die fast ausnahmslos günstigen Resultate mit Ammoniumsuccinat, — lactat, — — tartrat und — citrat, weiter die 13 von den 21 Kulturen von 7 Stämmen worin Entwicklung auftrat mit Ammoniak und Glucose, schliesslich vielleicht die Ureumkulturen (46 von den 52 angelegten Kulturen mit Glucose, 44 von den 49 mit Saccharose), wobei infolge der Hitze beim Sterilisieren Ammoniak abgespaltet ist.

In alkalischer Lösung wächst weder *B. Nicotianae* noch Uyedas *B. solanacearum* mit Ammontartrat und nach Zusatz von 1 % Glyzerin ändert sich das Resultat nicht. Die Deli-Stämme dagegen wachsen meistens ausgezeichnet in (nicht neutralisierter) Meyerscher Lösung mit 1 % Ammontartrat, nämlich in 30 von den 33 Kulturen (10 von den 11 Stämmen, und dieser eine negativ bleibende Stamm, Tu, zeigt übrigens keine Abweichungen). Vielleicht war das Wachstum der Bakterien Uyedas durch die Alkalisierung aufgehoben? Sowohl gegenüber Alkali als gegenüber Säure sind, wenigstens für mehrere Nährmittel wie Peptonbouillon, Peptonbouillongelatine und Chlorammon, die Deli-Stämme ziemlich empfindlich.

In saurer Lösung zeigten *B. Nicotianae* und *B. solanacearum* auch kein Wachstum mit 1 % Chlorammon, und letzterer zeigte nur schwache Entwicklung bei Darreichung von 1 % Dextrose; *B. Nicotianae* verweigerte sich auch dann. In Meyerscher Lösung mit 1 % Chlorammon und 1 % Glucose trat in 17 von den 18 Kulturen von 6 Stämmen keine Entwicklung ein, auch nicht wenn 1 % Glyzerin statt Glucose gegeben wurde (21 Kulturen von 7 Stämmen). Dies war ebenso wie bei Uyedas Versuchen bei saurer Reaktion.

Wenn jedoch mit $Na_2 CO_3$ neutralisiert wurde, trat ein ziemlich üppiges Wachstum ein, sowohl mit Glucose als mit Glyzerin. Sogar von alten und ganz geschwächten Selenitagarkulturen geimpft, wurde mit Glyzerin geringe Trübung sichtbar, aber nicht mehr mit Glucose. Es zeigt sich also, dass Ammoniakstickstoff sehr gut vom *B. solanacearum* verarbeitet werden kann, was aus den Resultaten Uyedas gewiss nicht zu ersehen ist.

Ammoniak wurde mit Nesslers Reagenz niemals in Kalinitrat-Kulturen gefunden, wohl aber in älteren Asparagin-Kulturen.

In der folgenden Tabelle sind alle die Resultate übersichtlich zusammengestellt. Falls weniger als 20 % von den angelegten Kulturen Wachstum zeigte, ist dies angedeutet mit der Ziffer 1; 21—40 % mit 2; 41—60 % mit 3; u. s. w.

VERGLEICHUNG DER RESULTATE MIT DEN VERSCHIEDENEN STICKSTOFF- UND KOHLENSTOFF-QUELLEN AUSGEDRÜCKT MIT DEN ZAHLEN 0 BIS 5 NACH DER ANZAHL KULTUREN MIT SICHTBAREM WACHSTUM.

C-QUELLE.	Asparagin.	Glycocoll.	KNO_3	NH_3
Arabinose	0	—	3	—
Glucose	3	2	3	4
Laevulose	1	0	0	—
Mannose	3	—	4	—
Galactose	4	—	5	—
Erythrit	4	—	4	—
Adonit	3	—	2	—
Sorbit	4	—	5	—
Sorbin	5	—	—	—
Mannit	5	5	5	—
Dulcit	5	—	5	—
Rhamnose	3	—	3	—
Saccharose	5	—	5	—
Maltose	3	4	4	—
Lactose	3	3	5	—
Raffinose	4	—	5	—
Quercit	3	—	2	—
Inosit	4	—	5	—

C-QUELLE.	Asparagin.	Glycocoll.	KNO_3	NH_3
Dextrin	4	—	4	—
Stärke	—	—	0	—
Glycogen	0	—	0	—
Inulin	5	—	1	—
Lichenin	0	—	0	—
Glyzerin	3	—	5	—
(Natrium) [1] acetat	0	—	0	0
„ butyrat	0	—	0	—
„ succinat	5	—	3	5
„ malat	5	—	3	—
„ lactat	0	—	0	5
Ammon tartrat	—	—	—	5
(Natrium) [1] citrat	3	—	3	5

Eigentlich geben nur die Kombinationen, welche gar kein Wachstum hervorrufen, die zuverlässigsten Kennzeichen, denn mit KNO_3 gibt es unter den 29 Kohlenstoffquellen keine einzige, womit alle Kulturen ausnahmslos gelungen sind, während es unter den 29 Kombinationen mit Asparagin nur 2 gibt — Natriumsuccinat und Natriummalat —, welche für 100 % Wachstum verursachten.

Solche Kombinationen, wobei Wachstum völlig ausblieb sind:

Asparagin mit Arabinose, Glycogen, Lichenin, Natriumacetat, Natriumbutyrat und Natriumlactat.

KNO_3 mit Laevulose, Stärke, Glycogen, Lichenin, Natriumacetat, Natriumbutyrat und Natriumlactat.

Wenn man KNO_3 mit Stärke ausser Betracht lässt, da

1) Oder Ammonverbindung in der vierten NH_3-Reihe.

Stärke nicht mit Asparagin untersucht ist, weichen die zwei Reihen nur in der Arabinose und der Laevulose von einander ab.

Die Anzahl Kulturen mit Wachstum ist verhältnismässig mit den Alkoholen etwas höher als mit den korrespondierenden Zuckern.

Ich muss nochmals betonen, dass die Bezeichnung 0 bis 5 sich nur auf die *Anzahl* der Kulturen mit Entwicklung bezieht, nicht auf die viel schwerer in Zahlen auszudrückende Stärke dieses Wachstums. Nicht immer geht eine grosse Anzahl mit starker Entwicklung zusammen, z. B. nicht mit Raffinose.

Die sonderbare *Variabilität* wird nur zu einem ganz kleinen Teil verursacht durch Stammunterschiede. Untersuchungen hierüber sind noch nicht abgeschlossen.

Uyedas Ergebnisse mit Bacillus Nicotianae und Bacillus solanacearum.

Unterzieht man die Übersichtstabelle Uyedas einer genauen Betrachtung, so leuchtet ein, dass mit Ausnahme der Punkte 5 und 15 der *Bac. Nicotianae schneller wächst, widerstandsfähiger ist gegen höhere Temperatur, und allerlei vermag, wozu der Bac. solanacearum nicht im Stande ist, oder erst nach längerer Zeit. Dagegen besitzt* Uyedas *B. solanacearum kein einziges positives Merkmal, benimmt sich botanisch gesprochen in einigen Merkmalen wie eine Verlust-Varietät des B. Nicotianae, in anderen wie mit geringeren Abstufungen versehen, und bakteriologisch gesprochen wie ein Stamm, der durch lange fortgesetzte Kultur geschwächt ist und viele Eigenschaften „verloren" hat.*

Punkt 5 ist mit dieser Annahme nicht im Widerspruch und Punkt 15[1]) ist, wie Smith mit Tabak schon für

1) Eigentlich 14, denn infolge eines Druckfehlers folgt im Original No. 7 auf No. 5.

seinen *Bac. solanaccarum* bewiesen hat, und wie meine Impfversuche mit Tabak und Capsicum ebenso beweisen, unwahr. Um den *Bac. Nicotianae* als selbständige Art beibehalten zu können, müsste man auch die Deli-Stämme zu einer neuen Art erheben, und dazu halte ich mich auch nach meinen 6300 Kulturen nicht für berechtigt.

Die Resultate der vergleichenden Versuche Uyedas lasse ich hier wörtlich folgen, ganz wie im Original:

Bacillus Nicotianae.	Bacillus solanacearum.
1. In Gelatinestrichkultur wächst der Bacillus ziemlich schnell, zuerst weiss, allmählich schwarz.	1. Auf Gelatinestrichkultur wächst der Bacillus sehr langsam, längs den Strichlinien. Die Färbung ähnelt mehr oder weniger der von *B. Nicotianae.*
2. Verflüssigt Gelatine ziemlich schnell, binnen etwa 2 Wochen bildet er Häutchen auf der Oberfläche des Gelatinestriches.	2. Verflüssigt Gelatine sehr schwach binnen 5 oder 6 Wochen.
3. Bildet etwas Gas in Glycoseagar oder Glycosebouillon, und produziert schwach ranzigen Geruch, ferner eine geringe Menge Saure.	3. Bildet auf Kartoffeln oder in glycosehaltiger Nährlösung kein Gas, auch keine Säuren auf Kartoffeln oder in Peptonwasser oder Bouillon, zu welchem Traubenzucker hinzufügt ist. Neutrale oder schwach sauer reagierende Nährlösung wird rasch alkalisch.

4. Milch wird anfangs koaguliert aber das Koagulum allmählich gelöst und peptonisiert.	4. Milch wird weder peptonisiert noch koaguliert.
5. Auf Kartoffeln bildet der Bacillus einen gelblichgrünen Farbstoff, der allmählich graubraun, zuletzt schwarz wird. Auf Agar werden runde schmutzig weisse Kolonien gebildet, die allmählich braunschwarz werden.	5. Bildet einen braunen Farbstoff in Nähragar oder in Peptonwasser, welches Traubenzucker enthält. Auf Kartoffel bildet der Bacillus zuerst einen gelblichweissen Farbstoff, welcher dann braun, zuletzt rauchschwarz wird.
7. Wächst am besten bei einer Temperatur van 32° C. Thermaltodpunkt ca. 55°.	7. Wächst üppig bei 37° C. Thermaltodpunkt ca. 52° C.
8. Fakultativ anaerobisch.	8. Streng aerobisch.
9. In Peptonbouillon oder Mohrrüben produziert der Bacillus einen unangenehmen Geruch.	9. Kein merklicher Geruch in den verschiedenen Kulturmedien.
10. Mit Methylenblau gefärbte Milch wird leicht reduziert. Durch Gries'sches Reagens kann man die Reduktion von Nitrat zu Nitrit nachweisen.	10. Es sind keine Reduktionsvorgänge wahrnehmbar.
11. Weist eine schwache Indolreaktion auf bei den Kulturen in Peptonlösung.	11. Keine Indolreaktion.
12. Bildet eine Oberhaut auf Bouillon binnen 3—4 Tagen.	12. In Bouillon oder Peptonlösung, bildet binnen 1—2 Wochen.

13. Gram'sche Färbung positiv.	13. Gram'sche Färbung negativ.
14. Sporen und Kapseln vorhanden.	14. Weder Sporen noch Kapseln.
15. Parasitisch für *Nicotiana Tabacum* und *Capsicum*, nicht aber für Eierpflanze und Tomate.	15. Parasitisch für Eierpflanze und Tomate, nicht aber für *Nicotiana* und *Capsicum*.

Vergleicht man damit meine Resultate, so stimmen die Deli-Stämme überein mit *Bac. Nicotianae* in den Punkten 3 (teilweise), 5, 8, 9 (teilweise), 10, 11 (teilweise), 12 (teilweise) und mit *Bac. solanacearum* in den Punkten 1, 2, 3 (teilweise), 4 (teilweise), 9 (teilweise), 11 (teilweise), 12 (teilweise), 13 und 14. Im 4. Punkt teilweise und im 15. völlig weicht das Verhalten von beiden Beschreibungen Uyedas ab, und wenigstens Punkt 15 is bestimmt unwahr. Schliesslich sieht man, dass die Nummern 3, 4, 9, 11 und 12 in beiden Reihen vorkommen.

Kurze Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse.

1. *Bacillus solanacearum* Smith verliert oft schnell die Virulenz.

2. Dieser Verlust der Virulenz tritt nicht plötzlich ein, sondern allmählich, zuerst gegenüber *Capsicum annuum*, später gegenüber *Nicotiana Tabacum*, schliesslich auch für *Solanum melongena* und *Solanum lycopersicum*.

3. Dieser Umstand erklärt den Widerspruch in den Mitteilungen von Smith und Uyeda.

4. In Deli ist der Bacillus bis jetzt von mir gefunden worden in: *Nicotiana Tabacum, Physalis angulata, Indigofera arrecta, Arachis hypogea, Mucuna* spec., *Acalypha boehmerioides, Ageratum conyzoides, Blumea balsamifera, Synedrella nodiflora.*

5. Nach künstlicher Infektion erkrankten auch *Sesamum orientale*, *Solanum tuberosum*, *S. lycopersicum*, *S. melongena* und *Capsicum annuum*.

6. Sowohl in morphologischen als in physiologischen Merkmalen ist die Variabilität des *Bac. solanacearum* viel grösser als bis jetzt berücksichtigt war.

7. In Kulturen mit Glycocoll und Glucose findet Kettenbildung statt. Die Fäden, bis über vierzig Zellen lang, sind meistens gekrümmt und enthalten hie und da stark gequollene, sich schlecht färbende Individuen, ohne dass jedoch anfangs die Virulenz verloren geht. Nach dem Impfen aus diesen Kulturen in Bouillon wird das Bild wieder normal.

8. Weder Kapseln noch Sporen werden bis jetzt von den Deli-Stämmen gebildet. Für das Vorkommen von Sporen hat Uyeda auch nicht den geringsten Beweis geliefert.

9. Die Deli-Stämme zeigen Polfärbung nach Fixation mit Alkohol oder in der Flamme und gefärbt mit Karbolfuchsin oder wässeriger Methylenblaulösung. Nur mit Peptonnahrung ist die Polfärbung oft undeutlich und kann sie sogar völlig verschwinden.

10. Auf einem Glas zu gleicher Zeit mit *Bacterium coli commune* und *Diplococcus enteritis* untersucht, sind die Deli-Stämme Gram-negativ.

11. Die Reduktion von Nitrat darf für *Bacillus solanacearum* (und wahrscheinlich auch für andere Bakterien) nicht mit Stärke als Kohlenstoffquelle studiert werden.

12. Natriumselenit hemmt das Wachstum, sehr stark bis zur völligen Aufhebung bei Darreichung von 0,1 % in Peptonbouillonagar, weniger mit 0,01 %. Es wird reduziert.

13. Die Verschiedenheit der Resultate, zu welchen Smith und Uyeda mit dem Wachstum in Milch gekommen sind, wird teilweise erklärt durch *a*) Stamm-

unterschiede, *b*) Alter der Kultur, *c*) sehr wahrscheinlich durch Unterschiede in der Zusammenstellung der Milch. Da Uyeda über die Milchkulturen in seiner ausführlichen Arbeit anders berichtet als in der vorläufigen Mitteilung und das Verhalten der Deli-Stämme ziemlich stark variabel ist, darf diesen Unterschieden als Artmerkmalen doch kein grosser Wert zugeschrieben werden.

14. Die Versuche mit frischer Milch lehrten, dass nur ausnahmsweise (in 4 von den 95 Kulturen) Koagulation eintritt, die übrigen Kulturen gaben alle ganz schwach alkalische Reaktion oder waren amphoter. Mit europäischer Milch in Blechdosen oder Flaschen ist nach 3 bis 7 Tagen die Reaktion immer alkalisch. Bei den meisten Stämmen wird wieder 3 bis 7 Tage später die Milch sauer und koaguliert sie alsdann. Aus alten geschwächten Kulturen geimpft bleibt jedoch die Reaktion eine alkalische.

15. Die Versuche mit Kombinationen von verschiedener C- und N-Nahrung geben teilweise absolut konstante Resultate, teilweise auch sehr schwankende, sogar nach Impfung aus einer und derselben Kultur.

16. Von den 18 Stoffen, welche zugleich Kohlenstoff- und Stickstoffquelle sein könnten, zeigte sich nur Wachstum mit Tyrosin, Pepton, Ammonsuccinat, -lactat, -tartrat und -citrat, in einigen Fällen auch mit Asparagin (in 7 von den 62 angelegten Kulturen, und diese 7 gehörten zu 3 Stämmen).

17. Alle Stickstoffquelle können Asparagin, Glycocoll, Kaliumnitrat, Kaliumnitrit und Ammoniak dienen.

18. Als Kohlenstoffquelle sind in den untersuchten Kombinationen absolut unbrauchbar: Glycogen, Stärke, Lichenin, Natriumacetat und -butyrat.

19. Niemals folgte Entwicklung in KNO_3- oder Glycocoll-Lösung mit Laevulose, mit Asparagin und Laevulose nur in vier Kulturen von zwei Stämmen. Da auch bisweilen

mit Asparagin allein Wachtum möglich war, liegt nichts Merkwürdiges darin.

20. Entwicklung in allen angelegten Kulturen ist äusserst selten mit Asparagin, Glycocoll und KNO_3. Sehr oft zeigen nur eine oder zwei von den drei zugleich angelegten Kulturen derselben Lösung Wachstum, wenn diese drei Kulturen aus einer und derselben Bouillon-, KNO_3- oder Glycocoll-Kultur geimpft werden.

21. Im allgemeinen ist die Anzahl Kulturen mit Entwicklung grösser mit einigen Alkoholen als mit den korrespondierenden Zuckern.

22. Nicht immer geht eine grosse Anzahl Kulturen mit sichtbarem Wachstum zusammen mit starker Entwicklung.

23. Weil die Deli-Stämme sowohl parasitisch sind für *Nicotiana tabacum* und *Capsicum annuum* (wie Uyedas *Bacillus Nicotianae*) als auch für Eierpflanze und Tomate (wie *Bacillus solanacearum* Smith) und obendrein fast alle der von Uyeda ausgesprochenen kulturellen Unterschiede fortgefallen sind, so halte ich es dafür, dass der *Bacillus Nicotianae* Uyeda identisch ist mit dem *Bacillus solanacearum* Smith.

Herrn Dr. W. A. Kuenen, Direktor, und Herrn J. F. v. d. Bosch, Assistenten des Medizinisch-Pathologischen Laboratoriums in Medan, statte ich hiermit meinen herzlichen Dank ab für ihre Ratschläge.

(Aus der biologischen Abteilung der Deli-Proefstation).